

RealCycler®

CHSL-G v.1

1 Uso previsto

RealCycler CHSL-G es un kit de reactivos que permite la detección cualitativa por PCR a tiempo real del ADN de *Chlamydia trachomatis* serotipo L (agente causal del linfogranuloma venéreo) en muestras clínicas. El sistema incluye un control interno de amplificación para prevenir los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción.

2 Especificaciones

- **Especificidad:** *Chlamydia trachomatis* serotipo L (gen pmpH). La validación de la especificidad ha sido realizada según ensayos experimentales y el análisis BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

3 Estabilidad y almacenamiento

Todos los componentes del kit *RealCycler* CHSL-G deben ser almacenados a -20ºC.
El kit es estable a - 20ºC hasta la fecha de caducidad (ver etiqueta externa del kit).

4 Descripción del método

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de una región específica del genoma del patógeno usando primers y sondas específicos. En la PCR a tiempo real se utilizan sondas marcadas con fluorocromos. Hay una emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra. El *Cycle threshold* (Ct) es el ciclo de la PCR en el que se detecta inicialmente un aumento en la señal de fluorescencia. La amplificación de *Chlamydia trachomatis* serotipo L se detecta en TxR y la del control interno en Alx532.

5 Composición

RealCycler CHSL-G incluye la mezcla de reacción **Amplimix** y un **Control Positivo ADN LGV**. Todos los reactivos están listos para su uso sin añadir ni reconstituir ningún componente.

Componente	Viales	Núm.	Volumen	Conserv.
AmpliMix		1	850 µL	-15 /-25 ºC
Control Positivo ADN LGV		1	120 µL	-15 /-25ºC

6 Material y equipamiento adicional requerido y no suministrado

- Equipo de PCR a tiempo real
- Kit de extracción de ADN
- Guantes desechables
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta con filtro
- Congelador (-20ºC)

Progenie molecular
Artes y Oficios 37. Valencia 46021. España. Tel. 902 91 05 05 Fax 902 91 05 06
www.progenie-molecular.com

7 Advertencias y precauciones

- Todos los componentes del kit deben mantenerse en frío mientras se están manipulando.
- Después de añadir el ADN, minimizar el tiempo necesario para iniciar el programa de amplificación.
- Los tubos con la mezcla de amplificación no deben exponerse a la luz durante un periodo de tiempo prolongado.
- Descongelar y congelar repetidas veces los reactivos puede disminuir la sensibilidad del kit.
- Usar guantes desechables.
- Usar pipetas calibradas y puntas de pipeta con filtro.
- Los ensayos deben llevarse a cabo por personal cualificado y siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Uso exclusivo para investigación.

8 Muestras clínicas

- Recoger las muestras en tubos estériles.
- Almacenarlas y transportarlas congeladas a -20ºC hasta su uso.
- Utilizar ADN bien purificado y libre de inhibidores de la PCR.

9 Procedimiento

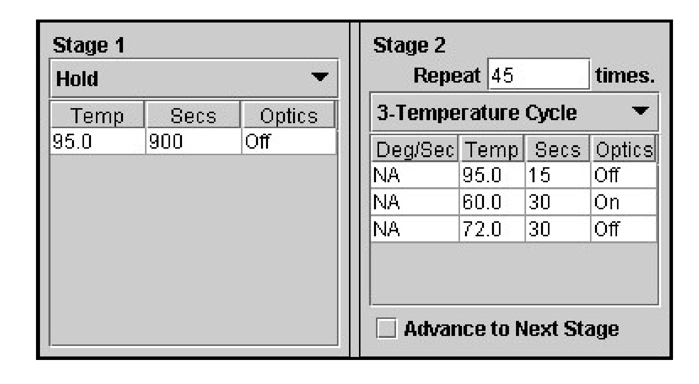
a) Extracción de ADN

El ADN se debe extraer de las muestras clínicas utilizando un procedimiento de extracción adecuado. Hay diferentes kits de extracción de ADN disponibles de distintos fabricantes. El volumen de la muestra depende del protocolo utilizado. Por favor realizar la extracción de ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este kit ha sido validado con los siguientes sistemas de extracción:
- QIAamp DNA Blood Mini kit (referencias 51104, 51106). QIAGEN.
- Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification kit (referencia AS1140). Promega Corporation.

Este kit puede ser utilizado con los siguientes sistemas de extracción:
- BioRobot EZ1.QIAGEN.
- QIAcube. QIAGEN.
- NucliSENS® easyMAG®. bioMérieux

b) Protocolo



Selección de fluoróforos:
- TxR: detecta *Chlamydia trachomatis* serotipo L.
- Alx532: detecta el control interno.

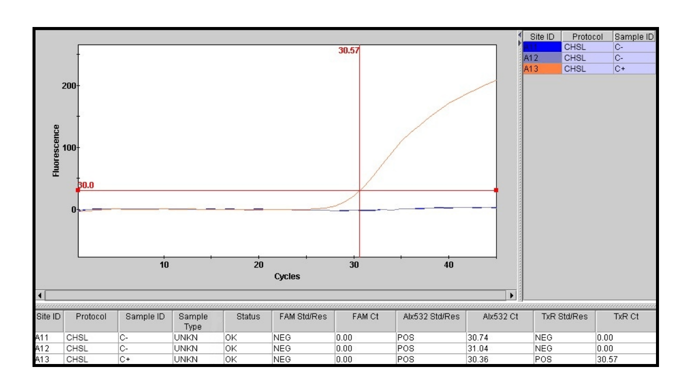
c) Preparación de la reacción

- Descongelar la **AmpliMix** y el **Control Positivo LGV**.
- Tomar una alícuota de **17,5 µL** de Amplimix y añadir **7,5 µL** del ADN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo.
- Seleccionar el protocolo "CHSL-G".
- Iniciar el programa de amplificación.

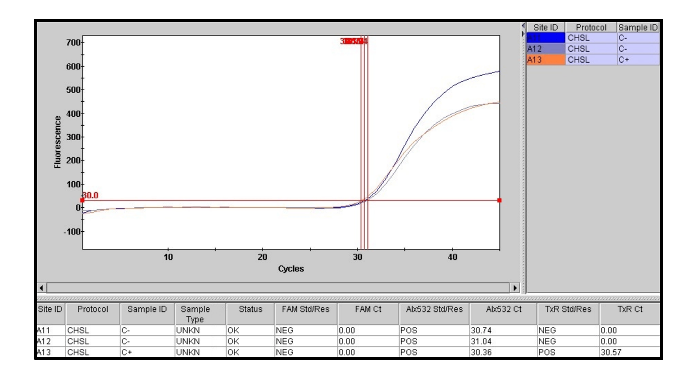
d) Interpretación de los resultados

TxR Std/Res	Alx532 Std/Res	Interpretación
POS	Indiferente	POSITIVO LGV
ND	POS	NO SE DETECTA
ND	ND	NO VALORABLE

e) Ejemplo de resultado



Gráfica 1 (Canal TxR: LGV): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos y un control positivo LGV. Control negativo (A11 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A12 en gris): ausencia de señal. Control positivo LGV (A13 en naranja): se observa señal con Ct=30,57.



Gráfica 2 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos y un control positivo LGV. Control negativo (A11 en azul): se observa señal con Ct=30,74. Control negativo (A12 en gris): se observa señal con Ct=31,04. Control positivo LGV (A13 en naranja): se observa señal con Ct=30,36.

10 Control de calidad

Se recomienda que se lleven a cabo controles positivos y negativos cada vez que se realice un análisis.

Cada lote del kit *RealCycler* CHSL-G ha sido testado según las especificaciones de la PCR a tiempo real utilizando el equipo *SmartCycler*® (*Cepheid*®).

11 Observaciones

Tabla de compatibilidad de fluoróforos.

Fluoróforo	Fluoróforo alternativo
FAM	
TET	CAL Fluor Gold 540
HEX	JOE, VIC, CAL Fluor Orange 560, Alexa 532
Texas Red	ROX, LC Red 610, CAL Fluor Red 610

Fecha de publicación: Marzo 2012.